

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11072

研究課題名(和文) 男性不妊症由来iPS細胞のエピゲノム解析および幹細胞研究による男性不妊症の解明

研究課題名(英文) Elucidation of male infertility by epigenome analysis of iPS cells derived from male infertility and stem cell research

研究代表者

小林 秀行 (KOBAYASHI, Hideyuki)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：10408875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの代替え種での研究を行なうためにまずは、マイクロミニピッグのiPS細胞の誘導を試みたが、完全なiPS細胞は樹立することはできなかった。そのため、生殖細胞への分化の実験は断念した。2016年の年末に電気工事の影響で、-80の冷凍庫が故障したため、それまでに冷凍庫内に保管していたTESEおよびmicro-TESEにて採取した精巣組織や、マイクロミニピッグの組織や細胞、その他試薬などすべてを失った。そのため、実験継続はできず、予定していた実験は施行できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究に用いる大半の組織をアクシデントにより失ったため、満足する研究は施行できなかった。しかし、マイクロミニピッグでのiPS細胞は、マウスやヒトに比べて難易度が高いことが分かった。マイクロミニピッグの研究は、ヒト生殖細胞の代替え研究としては重要な位置を占めていると考えている。今後は、マイクロミニピッグのiPS細胞の誘導をテーマとした研究も必須と思われる。また、現在、新たに男性不妊症患者における精巣組織を採取しており、集まったところで、研究の再開を予定したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We could not perform satisfied research because of we were damaged our freezer of -80. We lost all tissues, cells, and reagents due to this accident. However, we found that the induction of iPS cells derived from micro-minipigs are very difficult more than iPS cells of mouse and human. In future, we think that it is necessary to perform the induction of iPS cells derived from micro-minipigs. In present, we collect new testis tissues derived from patients with male infertility. We consider the restart of our research in future.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊症 iPS細胞 マイクロミニピッグ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近では挙児を希望するカップルの約 15%が不妊であり、不妊カップルの男性要因が約半数を占めている。特に、非閉塞性無精子症の患者では 1 匹の成熟精子さえも採取することが困難である。現在、非閉塞性無精子症患者の治療として、顕微鏡下に良好な精細管を採取し、成熟精子を探索する顕微鏡下精巣内精子回収法 (micro-TESE) が行なわれている。しかしこの方法で精子を得られる割合は 30%程度であり、micro-TESE に取って代わる次世代の治療法が待ち望まれている。これまでに代表者はペンシルバニア大学にてマウス精原幹細胞の *in vitro* での培養法を習得した。マウスでの基礎研究を土台としてヒト精原幹細胞の研究を行なっている。代表者はこれまでにヒト精巣組織より、THY-1 というマーカーにて分離した細胞群にヒト精原幹細胞が含まれている可能性を示唆する論文を発表している (Kobayashi H et al. 2009)。しかし、長期間の *in vitro* での培養は困難であり詳細な解析は困難であった。ゆえに長期間に渡る培養法の開発が今後の課題である。2007 年にヒト体細胞に特定の遺伝子を導入することにより、ES 細胞に近い iPS 細胞が誘導でき幹細胞研究は熾烈を極めていている (Takahashi K et al. 2007) (Yu J et al. 2007)。iPS 細胞は ES 細胞と同様の培養方法にて、かつ同じ性質を維持したまま、長期間の培養が可能である。代表者は、男性不妊症患者から iPS 細胞の誘導に成功している (Kobayashi H et al. 2011)。今後は、精巣組織由来 iPS 細胞を解析することにより、男性不妊症の解明の一端を担うであろうと考えている。また、代表者はこれまでに、293FT 細胞から iPS テクノロジーを用いて ES 様細胞の誘導に成功している (Oka Y, Kobayashi H et al. 2010)。さらに、クラインフェルター症候群患者の精巣組織から iPS 細胞の誘導に成功している (Kobayashi H et al. 2011)。さらに最近では、クラインフェルター症候群由来 iPS 細胞から拍動性の心筋様細胞の樹立に成功し、質の高い iPS 細胞を誘導する技術を獲得した (Shimizu T, Kobayashi H et al. 2015)。これまでの幹細胞研究を土台として男性不妊症の解明の一端を担うものと考えている。また、代表者が所属している施設では、男性不妊症患者の受診数は日本でも有数であり、micro-TESE の手術件数も多く、多数の非閉塞性無精子症患者の精巣組織を得ることができることも、この研究を行なう上で極めて有利な立場にあると自負する。今回、ヒト iPS 細胞研究を切り口として男性不妊症の解明を計画した。

2. 研究の目的

代表者のこれまでの研究で、ヒト精巣組織に精原幹細胞が含まれている可能性を示唆し、これらの細胞に RT-PCR にて生殖細胞に発現している VASA, DAZL の発現を確認している。しかし、1 週間程度の短期間の培養しか可能ではなく、詳細な解析は困難である。iPS 細胞は ES 細胞と同様に、同じ性質を維持しつつ長期間の培養が可能である。現在は、センダイウイルスを用いることにより、質の高い男性不妊症患者由来 iPS 細胞の誘導に成功している。心筋様細胞に分化誘導することに成功しており、実験の条件が揃えば生殖細胞への分化も理論的には可能である。しかし、倫理的な面もあり、容易には実験を行なうことはできない。そこで、代替種としてヒトに近いとされるマイクロミニピッグを用いた研究を行なう。また、ゲノム解析も必要と考える。次世代シーケンサーはゲノム解読だけでなく、mRNA の解析、タンパク質と DNA の相互作用、DNA にどういった化学修飾があるかというエピゲノムなど、多種多様に渡り用いられ始めている。特に、発生医学では、エピジェネティクスが深く関係しており、男性不妊症における原因の一角が解明される可能性を秘めている。下記の 3 点を研究期間内に明らかにすることを目的とした。

- ・男性不妊症患者由来 iPS 細胞より、セルトリ細胞やライディヒ細胞の誘導。
- ・マイクロミニピッグでの iPS 細胞の誘導および、生殖細胞への分化の検討。

・ヒト正常 iPS 細胞と男性不妊症患者 iPS 細胞の DNA メチル化の違いの比較。

3. 研究の方法

1. ヒト精巣組織の採取および取り扱い

東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヒト精巣組織を実験に用いる。東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンターを受診する患者を対象とする。書面を用いて、TESE および micro-TESE にて採取した精巣組織の一部を研究に用いる旨の説明を行なう。同意を得た患者の精巣組織を研究に用いる。採取した精巣組織は、HEPES 溶液に浸し、迅速に実験に用いるか、もしくは、-80 の冷凍庫に保存する。

2. ヒト精巣由来繊維芽細胞の樹立

あらかじめコラゲナーゼ処理及び DNase 処理したヒト精巣組織溶液を 10cm dish に全量まく。7%FBS+DMEM にて 14 日間培養を行なう。ほぼコンフルエントになるまで培養を行ない、精巣由来繊維芽細胞を樹立する。

3. センダイウイルスを用いた iPS 細胞の誘導方法

ディナベック社の CytoTune-iPS キットを用いる。これまで、iPS 細胞の作成にはレトロウイルスベクターが用いられてきたが、DNA に組み込まれてしまい、その後の分化の実験には不適切であった(Kobayashi H et al 2011)。センダイウイルスベクターは、細胞核の中に入らず、細胞質内で自らのゲノムを複製して大量のタンパク質を作り出す。このゲノムは核酸の種類としては RNA からできており、患者の染色体の DNA とは物質的に異なり、核内の染色体を改変するリスクは原理上なく、レトロウイルスベクターが持つ危険性を根本的に回避することができる。樹立した精巣由来繊維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc が搭載されたセンダイウイルスを作用させる。ウイルス作用後、7%FBS・DMEM にて 6-7 日間の培養を行なう。その後、MEF 細胞上に、ウイルスを作用させた精巣由来繊維芽細胞を 5×10^4 /10cm dish になるようにまき直す。培養は ES 培養液および bFGF にて行なう。実験開始後より、21 日目以降より、扁平状のコロニーが出現する。30 日目くらいに、これらのコロニーをピックアップし、MEF 細胞上で、培養を続ける。培養液の交換は毎日行ない、コロニーが分化しないようにする。

4. ヒト精巣組織と ES 細胞様コロニーが同一組織である証明方法

ヒト精巣組織と培養にて出現したコロニーが同一であるかどうかを調べるために STR 法を用いる。この方法を用いることにより、精巣組織と同一の由来であることを調べることができる。この実験は非常に重要で、ES 様細胞のコロニーがコンタミネーションでないことを証明する唯一の方法である。

5. RT-PCR や免疫染色による ES 細胞様コロニーの遺伝子発現様式

多能性幹細胞にみられる遺伝子の発現を RT-PCR や免疫染色で調べる。RT-PCR では、Nanog, Oct4 の発現を調べる。免疫染色では、Alkaline phosphatase, Nanog, Oct4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 を染色する。

6. ES 細胞様コロニーの in vitro および in vivo での機能解析

免疫不全マウスである 8 週齢の SCID マウスの精巣に麻醉下にて ES 細胞様コロニーを接種し、奇形腫を形成するかどうか検討する。3 ヶ月間、飼育を続ける。また、胚葉体形成を行ない、in vitro にて三胚葉に分化させる。これらの実験を行うことにより、精巣組織から誘導された ES 様細胞が多能性を有するかどうか証明することができる。

7. iPS 細胞からのセルトリ細胞やライディッヒ細胞の誘導の試み

これまでに、我々は、iPS 細胞から心筋様細胞の分化に成功している (Shimizu T, Kobayashi

H et al. 2015)。この経験を生かして、セルトリ細胞やライディッチ細胞の誘導を試みる。

8.次世代シーケンサーを用いた非閉塞性無精子症(NOA)患者由来 iPS 細胞と閉塞性無精子症(OA)患者由来 iPS 細胞での DNA メチル化解析

NOA と OA の違いは、成熟精子の有無であり、明確に DNA メチル化の差がみられると予想される。両者の DNA の bisulfite 処理を行なう。bisulfite 変換した DNA はアルカリ変性した後、酵素による全ゲノム増幅を行なう。増幅したゲノム DNA は酵素処理にて断片化を行なう。その後、イルミナ社の HumanMethylation450 BeadChip にアプライし、ハイブリダイズを行なう。標識ヌクレオチドを取り込ませ、蛍光色素標識抗体を用いて染色を行ない、iScan を用いて蛍光イメージを取得する。GenomeStudio/Methylation Module を用いてデータ解析を行なう。この解析にて、DNA メチル化頻度の有意な差を示すデータを得ることができる。有意な差を示すデータを用いて、クラスタリングを行なうことにより、男性不妊症の候補遺伝子を得ることが予想される。まずは、CpG Island 領域における遺伝子について着目していく。

9.マイクロミニピッグ iPS 細胞の誘導および、生殖細胞への分化誘導の試み

上記に示したヒトでの同様の手法にて、マイクロミニピッグの皮膚細胞から繊維芽細胞を樹立し、センダイウイルスにて iPS 細胞を樹立を目指す。樹立したマイクロミニピッグ iPS 細胞に BMP4 を作用させ、始原生殖細胞(PGCs)の分化誘導を試みる。ヒトやブタでの iPS 細胞では SSEA1 の発現はみられないが、PGCs に誘導されれば、SSEA1 の発現がみられる。SSEA1 の発現を免疫染色にて確認することにより、生殖細胞への分化誘導が行われているかどうか確認することができる。また、PGCs が分化をすすめるに従い、VASA の発現がみられるようになる。この誘導には、コロニー刺激因子(CSF)が重要な役割を果たしている。VASA の発現こそが、生殖細胞への分化の鍵分子と考える。他に、DAZL, DAZ が発現しているかどうか、RT-PCR を行ない発現を確認する。また、ヒト ES 細胞に DAZL, DAZ, BOULE を強制発現させることにより、減数分裂や半数体の形成を誘導したとの報告がある (Kehkooi K et al. 2009)。同様の方法にて、ブタでも生殖細胞が分化誘導できる可能性を秘めており、レンチウイルスを用いて、DAZL, DAZ, BOULE を過剰発現させ、生殖細胞への誘導を試みる。

4 . 研究成果

ヒトの代替種での研究を行なうためにまずは、マイクロミニピッグの iPS 細胞の誘導を試みた。マイクロミニピッグでの iPS 細胞の誘導を検討し、何度も実験を繰り返した。形態学的には、ES 細胞や、iPS 細胞と同様な扁平状のコロニーを得られることができたが、機能検査で、in vivo の実験において、奇形種の形成を確認できなかった(1)。おそらく、多能性が不完全な iPS 細胞が誘導できたと結論付けた。世界中でも、まだ、ピッグでの完全な iPS 細胞は樹立されておらず、おそらく、ヒトやマウスとは異なるシグナル伝達系が存在し、未分化を保ったまま iPS 細胞を培養することが難しいのであろう。結局、マイクロミニピッグでの iPS 細胞の樹立は失敗に終わり、生殖細胞への分化の実験は断念した。今後の更なる研究が必要である。

2016 年の年末に電気工事の影響で、- 80 の冷凍庫が故障し、温度上昇を引き起こした。そのため、冷凍庫内に保管していた TESE および micro-TESE にて採取した精巣組織や、マイクロミニピッグの組織や細胞、その他試薬などすべてを失った。そのため、実験継続はできず、検体を集めることから始まった。その作業は、2019 年まで行なったが、十分な検体を採取できず、予定していた実験は施行できなかった。

不慮のアクシデントで、検体をすべて失ったために予定していた研究はできなくなったので、代替の研究として、若年者が癌に罹患したときに、妊孕性温存のために精子凍結を行なうが、

その過去 10 年間にわたる統計を行なった。精子凍結を施行する疾患は、最も精巣腫瘍が多く、次に血液癌、3 番目に消化器癌であった。年々、精子凍結の件数は増えており、がん生殖の気運が高まっていることが分かった。癌を克服したあと、凍結された精子の使用率についても検討した。報告では、10%台の使用率と非常に低いことが言われている。我々の研究でも、9.0%台と使用率は決して高くなかった。原因としては、若年のときに癌の治療に追われ十分な教育を受けることができない。そのため、就職しても低収入であることが多く、未婚のままが多いことが挙げられる。また、結婚しても十分な貯蓄ができないため、拳児を希望しても金銭的に、凍結精子を用いた顕微授精は高額にて支払いが困難のためと考察した(2)。

- 80 の冷凍庫の故障にてすべての検体を失い、実験の継続が困難であったが、マイクロミニピッグマイクロミニピッグからの iPS 細胞は困難であることが分かった。また、世界中でも成功とはなっておらず、今後は、マイクロミニピッグ由来 iPS 細胞の樹立をテーマとして研究を行なうことが先決と考える。また、冷凍庫の故障にて研究検体を失った結果となったが、また新たに検体を集め再開を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamabe F, Nagao K, Nakajim K, Kobayashi H	4. 巻 5
2. 論文標題 Derivation of Induced Pluripotent Stem (iPS)-like Cells from Microminipig Somatic Cells by Sendai Viral Transduction of 4 HumanG, OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi H, Tamura K, Tai, T, Nagao K, Nakajima K	4. 巻 16
2. 論文標題 Semen cryopreservation as an oncofertility treatment in 122 Japanese men with cancer: A decade-long study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 320-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----